

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-047500

(43)Date of publication of application : 18.02.2003

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
G01N 27/327
G01N 27/416
G01N 27/48
G01N 33/483
G01N 33/50

(21)Application number : 2001-233859

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 01.08.2001

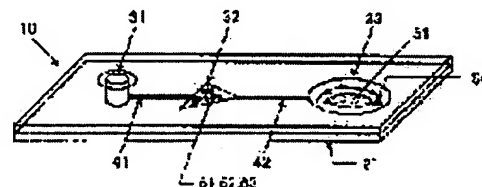
(72)Inventor : MAKINO YOSHIHIKO
MORI TOSHIHIRO
ABE YOSHIHIKO

(54) METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID FRAGMENT AND DETECTING KIT FOR TARGET NUCLEIC ACID FRAGMENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a target nucleic acid fragment, requiring neither a special technique nor a complicated operation and simply and rapidly performable by anyone by using small devices, and to provide a detecting kit for a target nucleic acid fragment, which can be space-saved and automated.

SOLUTION: The method comprises treating pyrophosphoric acid generated in polymerase elongation based on a specified base sequence of the target nucleic acid fragment with an enzyme reaction agent containing an oxidase and electrochemically detecting the electron transfer generated in acting the oxidase by using an electrode modified with molecules having redox activity, wherein the electron transfer is detected as electric current and the electrode is obtained by fixing the molecules having redox activity onto the surface thereof. Or the method comprises using a detecting kit applied with the method.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-47500

(P2003-47500A)

(43) 公開日 平成15年2月18日 (2003.2.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68	Z N A	C 1 2 Q 1/68	Z N A Z 2 G 0 4 5
G 0 1 N 27/327		G 0 1 N 27/48	Z 4 B 0 6 3
27/416		33/483	F
27/48		33/50	P
33/483		27/30	3 5 3 R
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-233859 (P2001-233859)

(22) 出願日 平成13年8月1日 (2001.8.1)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

(72) 発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

(74) 代理人 100085109

弁理士 田中 政浩

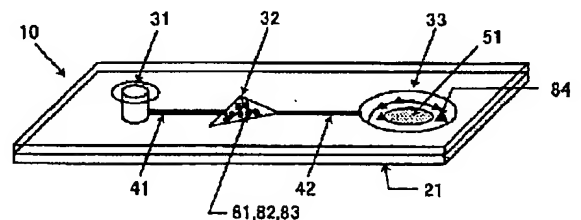
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ターゲット核酸断片の検出方法及びターゲット核酸断片の検出キット

(57) 【要約】

【課題】 特殊な技術や複雑な操作を必要とせず、誰でもが簡便かつ迅速に小型の装置を用いて実施することのできるターゲット核酸断片の検出方法、及び省スペースで自動化が可能なターゲット核酸断片の検出キットを提供する。

【解決手段】 上記課題は、ターゲット核酸断片の特定の塩基配列に基づくポリメラーゼ伸長反応の際に生成するピロリン酸に対して、酸化酵素を含む酵素反応試薬で処理し、酸化酵素が作用する際に起こる電子移動を、表面に酸化還元活性を有する分子が固定されている酸化還元活性分子修飾電極を用いて、電気化学的に電流として検出する方法、及びその方法を使用した検出キットによって解決される。



(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも一部の塩基配列が既知であるターゲット核酸断片に対し、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼの存在下に、前記ターゲット核酸断片を鋳型にして前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応が連続して進行するか否かにより、前記ターゲット核酸断片の存在または塩基配列を検出する方法において、前記ポリメラーゼ伸長反応により生成するピロリン酸に対して、少なくとも一種の酸化酵素を含む酵素反応試薬を作用させ、表面に酸化還元活性を有する分子が固定されている酸化還元活性分子修飾電極を用いて、電気化学的に電流を測定することを特徴とするターゲット核酸断片の検出方法

【請求項2】 ピロリン酸に作用させる酵素反応試薬が、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサントシンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬であることを特徴とする、請求項1に記載のターゲット核酸断片の検出方法

【請求項3】 酸化還元活性分子修飾電極が、フェロセニル基を有する分子が表面に固定されている電極であることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の、ターゲット核酸断片の検出方法

【請求項4】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択される、請求項1、2または請求項3のいずれかに記載のターゲット核酸断片の検出方法

【請求項5】 電気化学的な電流の測定が、サイクリックボルタンメトリーまたはディファレンシャルパルスボルタンメトリーであることを特徴とする、請求項1、2、3または請求項4のいずれかに記載のターゲット核酸断片の検出方法

【請求項6】 キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサントシンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬、電気化学活性分子修飾電極の各要素を含むターゲット核酸断片の検出キット

【請求項7】 要素として、検出するターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼを含有するポリメラーゼ伸長反応試薬を更に含む請求項6に記載のターゲット核酸断片の検出キット

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査、及び個人の遺伝的な特徴による遺

伝的疾患の検査等に有効である、特定の塩基配列を有するターゲット核酸断片を検出する方法に係わり、特に、ターゲット核酸を鋳型とするポリメラーゼ伸長反応が進行したか否かを酸化還元活性分子修飾電極を用いて検出することにより、簡便にターゲット核酸断片の存在またはターゲット核酸断片の塩基配列を検出する方法、及びその方法を使用するターゲット核酸断片の検出キットに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査においては、血液等の体液、糞便、喀痰等を試料とし検体の培養を行い、ウイルス、細菌等の病原体を同定することが行われている。しかしながらこれらの方法は、検体を培養するのに非常に長い時間を必要としたり、ウイルス、細菌の種類によっては培養自体がうまくゆかないという問題もある。また検体を培養するには特別の技術を要する点でも、必ずしも迅速、簡便に満足 of いく結果が得られる方法ではない。

【0003】 また、抗原抗体反応を利用してウイルス、細菌等の病原体を同定する方法も行われている。この方法は、検査の自動化も可能であり、迅速性、簡便性の点では良い方法である。しかしながら、病原体を抗原として検出する抗原検出方法においては、試料中に存在する病原体の量が不足することにより、病原体を検出できない場合があり、感度的に問題がある。また、病原体の種類に固有な抗原部位を決定することが困難であるという問題もある。一方、病原体の感染により体内で産生された抗体を検出する抗体検出法においては、病原体の感染から抗体が産生されるまでに時間が必要で、その期間は検出できないという問題がある。

【0004】 これらに対して、ウイルス、細菌等の病原体の種類に固有な塩基配列を持つ核酸断片（ターゲット核酸断片）を、塩基配列の相補性を利用して検出する方法は、病原体を直接に同定することを可能にする方法であり、DNAプローブ法またはPCR（ポリメラーゼチェーンリアクション）法などの遺伝子検査法として普及している。例えば、HCV（C型肝炎ウイルス）遺伝子検査法は、C型肝炎のインターフェロン（INF）治療におけるINF投与の検討、治癒のモニタリングにおいて、HCV量を直接知ることのできる方法として威力を発揮している。

【0005】 今後さらに、ウイルス、細菌等の病原体の遺伝子的特長（Genotype）が明らかにされ、その遺伝子的特徴を利用した新しい治療薬が開発されることが期待できる。その場合には、病原体の同定のみならず、その病原体の遺伝子的特徴を知ることが非常に重要である。まさに遺伝子検査法はその需要を満たすことのできる検査方法である。

【0006】 一方、病原体の同定に限らず、遺伝子検査法では個人の遺伝的な特徴を直接検出することが可能

(3)

3
 であるので、遺伝子疾患の原因である遺伝子の変異の検出、癌や糖尿病などの生活習慣病などの病気にかかりやすさを左右している遺伝的要因の検出にも用いることができる。特に、ヒトゲノムの全塩基配列が決定された後は、ポストゲノム研究として、今まで以上に遺伝子的特長と疾患の関係が明らかにされていき、さらに遺伝子的特長を利用した治療薬が開発されていくことが期待できる。ポストゲノム研究の進展に伴って、今後ますます遺伝子検査法の需要が大きくなっていくことが予想される。

【0007】しかしながら、現在行われている遺伝子検査法には特殊な技術、複雑な操作、及び特殊な装置等が必要であり、遺伝子検査法を実施できる施設は、大規模な検査センターなどに限られている。ウイルス、細菌等による感染症の検査においても、また個人の遺伝子的特長の検査においても、診断、治療の指針の決定がその場で、できるだけ速く行えればより効力を発揮する。そのためには、誰でもが簡単な操作で実施でき、検査結果を迅速に得ることのできる新しい遺伝子検査法が必要である。

【0008】これまでも簡便性、迅速性の向上を目指して、ターゲット核酸断片を鋳型としたポリメラーゼ伸長反応の進行の検出を利用した遺伝子検査法が開発されている。ターゲット核酸断片の特定核酸領域をPCRにより増幅する際、増幅産物の生成の過程を蛍光強度の変化としてリアルタイムで検出する方法(Real Time PCR法)は、PCR後に増幅産物を電気泳動し、結果を解析するという工程を必要としないことから迅速性の点で良い方法であり、TaqManプローブ法(P E Biosystems社)、およびMolecular Beacon法(Stratagene社)として商品化されている。しかし、これらの方法は、FRET(fluorescence resonance energy transfer)を利用した方法で、実施には蛍光強度の変化を測定することのできる装置と、蛍光色素とそのクエンチャー(quencher)が組み合わせて標識された特殊なハイブリダイゼーションプローブを用意する必要がある点で問題があり、未だ特殊技術の域を出ていない。

【0009】また、インターカレータ性蛍光物質の存在下でターゲット核酸断片の特定核酸領域をPCRで増幅し、その際の蛍光強度の変化を検出する方法(IM-PCR: intercaration monitoring PCR法)が、文献「医学のあゆみ Vol. 173, No. 12, 1995」に記載されている。この方法は、Real Time PCR法としては、特別なハイブリダイゼーションプローブを必要としない点で良いが、やはり実施には蛍光強度の変化を測定することのできる装置が必要である。また、ターゲット核酸断片の特定核酸領域のPCR増幅の有無にかかわらず、インター

4

カレータ性蛍光物質は系内に存在する核酸断片全てに結合するので、特異性の点でも問題がある。

【0010】一方、ターゲット核酸断片の特定領域にヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、デオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼ、及びヌクレアーゼの存在下で伸長反応、分解反応を繰り返して、生成するピロリン酸又はデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出する方法が、特開平7-231799号公報に開示されている。ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロリン酸を検出することによるターゲット核酸断片の検出方法は、ポリメラーゼ伸長反応の副産物である一般化学物質を検出することで、ターゲット核酸断片の検出を可能にしている点で優れている。しかしながら実施の形態において、ピロリン酸をアデノシン-5'-ホスホサルフェートおよびアデノシン3リン酸(ATP)スルフィラーゼと反応させてアデノシン3リン酸(ATP)を生成させ、次いで生成したATPをルシフェリンとルシフェラーゼとの反応時に生じる発光を検出するために、検出には発光を測定することのできる装置が必要であり、簡便性の点で問題が残る。また、ヌクレアーゼ耐性を有するプライマーを使用し、かつDNAポリメラーゼとヌクレアーゼを併用し、ポリメラーゼ反応とヌクレアーゼ反応を繰り返して実施することで、実質的に連続して伸長反応が進行しない条件で実施される点では本発明とは異なるものである。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特殊な技術や複雑な操作を必要とせず、誰でもが簡便かつ迅速に小型の装置を用いて実施することのできるターゲット核酸断片の検出方法を提供することを課題とする。またこれらの目的を達成するために、省スペースで自動化が可能なターゲット核酸断片の検出キットの提供も課題とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために、ターゲット核酸断片の特定の塩基配列に基づくポリメラーゼ伸長反応の際に生成するピロリン酸に対して、酸化酵素を含む酵素反応試薬で処理し、酸化酵素が作用する際に起こる電子移動を、表面に酸化還元活性を有する分子が固定されている酸化還元活性分子修飾電極を用いて、電気化学的に電流として検出することで、簡便性、迅速性に優れたターゲット核酸断片の検出を行えることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】即ち、本発明は、少なくとも一部の塩基配列が既知であるターゲット核酸断片に対し、当該ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)、及び少なくとも一種のポリメラーゼの存在下に、前記ターゲット核酸断片を鋳型にして前記プラ

(4)

5

イマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応が連続して進行するか否かにより、前記ターゲット核酸断片の存在またはターゲット核酸断片の塩基配列を検出する方法において、前記ポリメラーゼ伸長反応により生成するピロリン酸に対して、少なくとも一種の酸化酵素を含む酵素反応試薬を作用させ、表面に酸化還元活性を有する分子が固定されている酸化還元活性分子修飾電極を用いて、電気化学的に電流を測定することを特徴とするターゲット核酸断片の検出方法にある。

【0014】また、本発明の別の形態での、ターゲット核酸断片検出方法の好ましい形態は以下の通りである。

(イ) ピロリン酸に作用する酵素反応試薬が、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサントシンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬である。

(ロ) 酸化還元活性分子修飾電極が、フェロセニル基を有する分子が表面に固定されている電極である。

(ハ) ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択されるポリメラーゼである。

(ニ) 電気化学的な電流の測定が、サイクリックボルタンメトリーまたはディファレンシャルパルスボルタンメトリーである。

【0015】また、本発明の別の形態は、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサントシンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬、及び酸化還元活性分子修飾電極の各要素を含むキットにある。

【0016】さらに、本発明の別の形態は、検出するターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸（dNTP）、及び少なくとも一種のポリメラーゼを含有するポリメラーゼ伸長反応試薬、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びキサントシンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬、及び酸化還元活性分子修飾電極の各要素を含むキットにある。

【0017】以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(A) ターゲット核酸断片：本発明において検出の対象となるターゲット核酸断片とは、少なくとも一部の塩基配列が既知であるポリヌクレオチドであり、動物、微生物、細菌、植物などすべての生物から単離されるゲノミックDNA断片が対象となり得る。またウイルスから単離可能なRNA断片またはDNA断片、およびmRNAを鋳型として合成されたcDNA断片も対象とすることが可能である。ターゲット核酸断片はできる限り精製され、核酸断片以外の余分な成分が取り除かれていること

6

が望ましい。例えば、動物（例えば人間）の血液から単離したゲノミックDNA断片を対象とする場合または血液中に存在する感染細菌やウイルスの核酸（DNAまたはRNA）断片を対象とする場合、単離の過程で破壊された白血球細胞膜、赤血球中から溶出したヘモグロビン、および血液中に存在するその他の一般化学物質は、十分に取り除いておく必要がある。特にヘモグロビンは、続いておこなうポリメラーゼ伸長反応を阻害する。また血液中に一般生化学物質として存在するピロリン酸やリン酸は、ポリメラーゼ伸長反応により生成するピロリン酸の正確な検出の妨害要因になる。

【0018】(B) ターゲット核酸断片と相補的なプライマー：本発明において使用するターゲット核酸断片と相補的なプライマーは、ターゲット核酸断片の塩基配列が既知である目的の部位に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。このターゲット核酸断片と相補的なプライマーがターゲット核酸断片の目的の部位にハイブリダイゼーションすることで、プライマーの3'末端を起点に、ターゲット核酸を鋳型としポリメラーゼ伸長反応が進行する。即ち、本発明においてはプライマーがターゲット核酸断片の目的の部位を認識して特異的にハイブリダイゼーションするかがポイントとなる。本発明で使用するプライマーの好ましい塩基数は5～60塩基である。特に好ましくは15～40塩基である。プライマーの塩基数は少なすぎると、ターゲット核酸断片の目的の部位との特異性が低下するだけでなく、ターゲット核酸断片とのハイブリッド自体が安定に形成できない。また、プライマーの塩基数は多すぎると、プライマー間またはプライマー内で塩基間の水素結合により2本鎖を形成してしまい、やはり特異性が低下する。

【0019】本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の存在を検出する場合、ターゲット核酸断片の異なる部位に対して、それぞれの部位に相補的なプライマーを複数使用することも可能である。このようにターゲット核酸断片を複数の部位で認識することで、ターゲット核酸断片の存在の検出において、特異性が向上する。また、ターゲット核酸断片の一部を増幅（例えばPCR法）する場合には、その増幅法に応じて複数のプライマーを設計することも可能である。本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の塩基配列を検出する場合、特に変異または多型の有無を検出する場合は、目的の変異または多型の部分を含むように、変異または多型に対応する塩基の種類でプライマーを設計する。そうすることで、ターゲット核酸断片の変異または多型の有無により、ターゲット核酸断片へのプライマーのハイブリダイゼーションの有無に差異が生じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することが可能になる。また、変異または多型に対応する部分をプライマーの3'末端付近に設定することでポリメラーゼの反応部位の認識に差異が生

(5)

7

じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することも可能である。

【0020】(C) ポリメラーゼ：本発明において使用するポリメラーゼは、ターゲット核酸がDNAの場合は、ターゲット核酸断片の一本鎖に変性された部分にプライマーがハイブリダイゼーションすることで形成された2本鎖の部分を起点として、5'→3'の方向に、デオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)を材料として、ターゲット核酸断片を鋳型にして相補的な伸長反応を触媒するDNAポリメラーゼである。具体的に使用されるDNAポリメラーゼとしては、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ等がある。DNAポリメラーゼは目的に応じて選択または組み合わせることが可能である。例えば、ターゲット核酸断片の一部を増幅(例えばPCR法)する場合には、耐熱性に優れたTaq DNAポリメラーゼを用いることが有効である。また、文献「BIO INDUSTRY, Vol. 18, No. 2, 2001」に記載されている増幅法(LAMP法: Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA)を用いてターゲット核酸断片の一部を増幅する場合には、5'→3'方向へのヌクレアーゼ活性がなく、かつ鋳型上の2本鎖DNAを1本鎖DNAとして遊離させながら伸長反応を触媒する鎖置換型のDNAポリメラーゼとして、Bst DNAポリメラーゼを使用することが有効である。その他、目的に応じて、3'→5'方向へのヘキソキナーゼ活性を持つ、DNAポリメラーゼα、T4 DNAポリメラーゼ、及びT7 DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0021】また、RNAウイルスのゲノミック核酸またはmRNAがターゲット核酸断片である場合には、逆転写活性を有するリバーストランスクリプターゼを使用することが可能である。さらにリバーストランスクリプターゼとTaq DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0022】(D) ポリメラーゼ伸長反応：本発明において対象となるポリメラーゼ伸長反応には、前記(A)に記載されているようなターゲット核酸断片の1本鎖に変性された部分の一部に特異的にハイブリダイゼーションした、前記(B)に記載されているようなターゲット核酸断片と相補的なプライマーの3'末端を起点として、デオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)を材料として、前記(C)に記載されているようなポリメラーゼを触媒として、ターゲット核酸断片を鋳型にして進行する相補的な核酸の伸長反応の全てが含まれる。この相補的な核酸の伸長反応とは、少なくとも2回(2塩基分)、連続しての伸長反応が起こることをさしている。

【0023】以下に、例として代表的なポリメラーゼ伸長反応、およびポリメラーゼ伸長反応を伴うターゲット

8

核酸断片の目的部位の増幅反応の例を示す。ターゲット核酸断片を鋳型にして、5'→3'の方向へのポリメラーゼ伸長反応を一度だけ行う場合が最も単純である。このポリメラーゼ伸長反応は等温の条件で実施することができる。この場合には、ポリメラーゼ伸長反応の結果として生成するピロリン酸の量は、最初のターゲット核酸断片の量に比例する。即ち定量的にターゲット核酸断片の存在を検出するのに適した方法である。

【0024】ターゲット核酸の量が少ない場合は、ポリメラーゼ伸長反応を利用した何らかの手段でターゲット核酸の目的部分を増幅することが好ましい。ターゲット核酸の増幅には、これまで開発、発明されてきた各種の方法を使用することができる。ターゲット核酸の増幅法で最も一般的で普及している方法はPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法である。PCR法は、反応液の温度の上げ下げを周期的にコントロールすることにより、ディネイチャー(核酸断片を2本鎖から1本鎖に変性する工程)→アニーリング(1本鎖に変性した核酸断片にプライマーをハイブリダイズさせる工程)→ポリメラーゼ(Taq DNAポリメラーゼ)伸長反応→ディネイチャーの周期的な工程を繰り返すことで、ターゲット核酸断片の目的部分を増幅する方法である。最終的に、ターゲット核酸断片の目的部位は初期量の100万倍にも増幅し得る。そのためPCR法の増幅過程でのポリメラーゼ伸長反応で生成するピロリン酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。しかしながらPCR法を用いた場合には、ターゲット核酸断片の目的部位は指数的に増幅するために、ターゲット核酸断片の初期量を定量的に検出することは困難である。

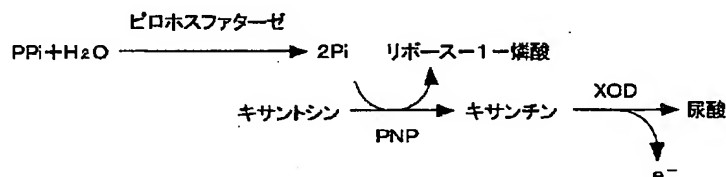
【0025】特開平5-130870号公報に記載されている、エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法もポリメラーゼ伸長反応を利用した、ターゲット核酸断片の目的部位の増幅法の一つである。この方法はターゲット核酸断片の目的部位に特異的にハイブリダイゼーションしたプライマーを起点とした、ポリメラーゼ伸長反応とともに、5'→3'エクソヌクレアーゼを作用させて、プライマーを逆方向から分解する方法である。分解したプライマーの代わりに新たなプライマーがハイブリダイゼーションし、再度DNAポリメラーゼによる伸長反応が進行する。このポリメラーゼによる伸長反応と、この先に伸長した鎖を外すエクソヌクレアーゼによる分解反応が順次、周期的に繰り返される。ここで、ポリメラーゼによる伸長反応とエクソヌクレアーゼによる分解反応は等温条件で実施することが可能である。このサイクリングアッセイ法においても繰り返されるポリメラーゼ伸長反応で生成するピロリン酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。

【0026】近年、新しいターゲット核酸断片の目的部位の増幅法として、LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification

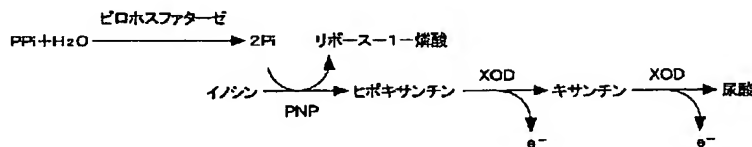
(7)

【0030】

(2)



※ ※ 【化2】



【0033】式（１）または式（２）に示した酵素反応において、キサンチンまたはヒポキサンチンがキサンチンオキシダーゼ（XOD）により酸化される際に電子移動が起こる。本発明においては、この電子移動を検出する。

【化 1】

【0036】本発明で用いられる電極は、導電性を持た
50 ない基体上に複数の電極が配置されたものであることが

(7)

11

好ましい。その場合、電極は、導電性を持たない基体上に、互いに接しないように、かつ規則的に配置されていることが好ましい。例えば、板上の基体上に電極が規則的に配置された電極を好ましく使用できる。また底面に電極を備えたウエル（穴）が基体に規則的に配置された電極、および先端に電極を備えている棒状の基体を規則的に配置したものも好ましく使用できる。

【0037】導電性を持たない基体としては、電気絶縁性の疎水性担体、あるいは電気絶縁性の低親水性の担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。基板の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができるが、各種ポリマー、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。基体の厚さは、特に限定されないが、板状である場合には、100乃至10000 μm の範囲にあることが好ましい。

【0038】導電性を持たない基体上に複数の電極が配置されたものとしては、導電性を持たない基体の表面を上記の電子伝導体で処理したものをを用いることが好ましく、金を蒸着したものを用いることが特に好ましい。基体は、電子伝導体で表面処理をする前に、基体上に親水性の高分子物質からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって基体の凹凸を軽減することができる。また、基体によっては、その基体中に電荷を有する親水性の高分子物質を含ませることも可能であり、このような処理を施した基体も好ましく用いることができる。

【0039】導電性を持たない基体上に複数の電極が配置されたものとしては、文献「Sosnowski, R. G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1119-1123, 1997」に記載の、シリコンチップも好ましく用いることができる。また、プリント配線基板のように、基体上に印刷されてなるものであってもよい。

【0040】(G) 酸化還元活性分子修飾電極：本発明で使用する酸化還元活性分子修飾電極は、前記(F)に示したような電極の表面に酸化還元活性分子が固定されている電極である。

【0041】電極表面に酸化還元活性分子を固定するには、電極が金電極の場合には、酸化還元活性を有する部位を有するチオール化合物を用い、その水溶液、バッファ溶液または有機溶剤溶液を金電極表面に接触させ、

12

放置することで、酸化還元活性分子を金電極表面に固定することができる。具体的には、酸化還元活性を有する部位がフェロセニル基である場合、フェロセニルアルカンチオールを金電極表面に作用させることで、表面に酸化還元活性分子が固定されている酸化還元活性分子修飾電極を作製することができる。

【0042】この場合、フェロセニルアルカンチオールのチオール基（-SH）が金表面と反応して、Au（金）-S結合を形成すると共に、アルキル長鎖同士の相互作用によって、アルキル長鎖を介して金表面とは反対側にフェロセニル基が並んだ構造の、高い配向性をもつ単分子膜（Self-Assembled Monolayers : SAMs）を形成することが知られている。

【0043】上記の単分子膜を形成する際、連結基を介してオキシダーゼを結合することが可能な官能基を有するアルカンチオール（具体例としてはアミノアルカンチオール）と、上記フェロセニルアルカンチオールとの二成分系で単分子膜を形成し、単分子膜表面に部分的にオキシダーゼ（具体例としてはキサンチンオキシダーゼ）を固定した酸化還元活性分子修飾電極を作製することも可能である。

【0044】このような部分的に酸化酵素を固定した酸化還元活性分子修飾電極は、文献「Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 413, 377 (1996)」に、試料中のグルコースを定量する方法に使用する酸化還元活性分子修飾電極として記載されている。しかしながら、上記文献に記載されている方法は、部分的に酸化酵素（グルコースオキシダーゼ）を固定した酸化還元活性分子（フェロセニルアルカン）修飾電極を用いて、前記酸化酵素がその基質であるグルコースを酸化する際に起こる電子移動を、フェロセニル基をメディエータとして、前記グルコースを定量する方法であり、本発明の一つの形態である、ターゲット核酸断片を鋳型にしたポリメラーゼ伸長反応により生成するピロリン酸に対して、酸化酵素を含む酵素試薬を作用させて、その際に起こる電子移動を酸化還元活性分子修飾電極を用いて検出することで、ターゲット核酸断片の存在またはターゲット核酸断片の塩基配列を検出する方法とは異なるものである。

【0045】このような酸化還元活性分子修飾電極では、その表面に固定された酸化還元活性分子により、前記(E)で示したような、ピロリン酸に対して作用する酵素反応において、酸化酵素が作用する際に起こる電子移動を仲介する。図1は、電極(111)上に固定されているフェロセニルアルカンチオール(121)が、酸化酵素(131)と電極(111)の間の電子移動を仲介している模式図である。電極(111)上に固定されたフェロセニルアルカンチオール(121)により、酸化酵素(131)が作用する際に発生する電子が電極に伝達される。即ち、フェロセニルアルカンチオール(12

(8)

13

1) は、酸化酵素(131)と電極(111)の間の電子移動反応を仲介している。

【0046】(H) キット: 本発明のターゲット核酸の検出は、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサンチンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬、及び酸化還元活性分子修飾電極の各要素を含む、本発明に係わるキットを用いて好ましく実施することができる。

【0047】上記のキットは、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサンチンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬を保持し、酸化還元活性分子修飾電極を備えているカートリッジ(容器)であっても良い。

【0048】このキットを用いてターゲット核酸の検出を行う場合は、ターゲット核酸断片、ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)、及び少なくとも一種のポリメラーゼにより、予めポリメラーゼ伸長反応を行った反応液を、上記のキットに供給することで、ターゲット核酸断片の検出を行う。

【0049】上記のポリメラーゼ反応を、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサンチンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬を保持し、酸化還元活性分子修飾電極を備えている、前記カートリッジ(容器)の中で実施することも可能である。

【0050】また、キットの別の形態として、少なくとも一部の塩基配列が既知であるターゲット核酸断片を含む液体を供給することのできる開口部と、ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)、及び少なくとも一種のポリメラーゼを保持することのできる少なくとも一つの反応セル部と、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサンチンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬を保持し、酸化還元活性分子修飾電極を備えている検出部と、及び前記開口部、反応セル部、検出部の間を連結し、液体を移動させることのできる細管または溝とを備えているカートリッジを用いて実施することも可能である。

【0051】図2には、本発明におけるカートリッジ形態のキットの一例を示した。キット(10)において、開口部(31)からターゲット核酸を含有する試料液を供給することができる。開口部(31)は細管(41)によって、反応セル(32)と連結されている。反応セル(32)には、予めターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー(81)、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)(82)、及び少なくとも一種のポリメラーゼ(83)が保持されている。さらに、反応セル(32)は細管(4

14

2)によって、検出部(33)と連結されている。検出部(33)には予めキサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びキサンチンオキシダーゼを含有する酵素反応試薬(84)が保持され、酸化還元活性分子修飾電極(51)が備えられている。反応セル(32)でポリメラーゼ伸長反応が進行した試料液は、細管(42)を移動して、検出部(33)に供給される。検出部(33)に供給された試料液中の、ポリメラーゼ伸長反応により生成したピロリン酸に対して酵素反応試薬(84)が作用し、その際に起こる電子移動を、酸化還元活性分子修飾電極(51)で電流として検出する。上記キット(10)において、開口部(31)と反応セル(32)の間、及び反応セル(32)と検出部(33)の間の液体の移動は、遠心力、電気泳動または電気浸透などを用いることが可能である。また、反応セル(32)、細管(41、42)、検出部(33)は、基体(21)と蓋(22)によって密封されていることが望ましい。

【0052】図2に示したようなキット(10)を使用する場合、図3に示したように、反応セル(32)および検出部(33)の温度をコントロールすることのできる部分(61、62)と、酸化還元活性分子修飾電極(51)上の電子移動を、電気化学的に電流として検出する部分(71)を備えている装置を合わせて使用することが望ましい。

【0053】本発明で使用するもののできるカートリッジ形態のキットは、図2に示されているものに限らない。ポリメラーゼ伸長反応に必要な試薬はそれぞれ別のスペースに保持されていても良い。その場合は、反応時にそれぞれの試薬が反応セルに移動してくるようになれば良い。酵素反応試薬が別々に、検出部以外のスペースに保持されていても良い。その場合は、検出時に試薬が検出部に移動してくるようになれば良い。

【0054】また、1つのカートリッジ上に「開口部-細管-反応セル-細管-検出部」の組を平行に並べて、または同心円の半径方向に並べて、複数組設置することも可能である。この場合、例えば反応セルに保持するターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマーの塩基配列を、ターゲットとする核酸の種類に応じて変更することで、同時に複数種のターゲット核酸を検出することが可能なキットを提供できる。

【0055】

【実施例】以下、実施例にて本発明を詳細に説明する。しかしながら、本実施例により本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

【0056】実施例1 酸化還元活性分子修飾電極を用いたY染色体短腕上のSRY遺伝子関連部位の検出
(1) 酸化還元活性分子修飾電極の作製
面積が1.0mm²の金電極を、8-フェロセニル-1-ヘキサンチオール(1mM)のエタノール溶液(2

(9)

15

μL)に浸漬し、25℃で18時間放置した。その後、金電極表面をエタノールで洗浄し、さらに超純水で洗浄し、次いで乾燥することにより、酸化還元活性分子修飾電極を作製した。

【0057】(2) ターゲット核酸断片試料液の調製
男性、女性、各々1人づつから採取した血液検体に対して、市販の核酸抽出精製キット(QIAGEN社製、QIAamp DNA Blood Mini Kit)を用いて、抽出、精製したゲノミック核酸断片を1mLの精製蒸留水中に回収することで、ターゲット核酸断片試料液を調製した。

【0058】(3) プライマーの調製
プライマーは、Y染色体短腕上のSRY遺伝子の特異的に認識できるように設計した塩基配列を持つ、オリゴヌクレオチドのプライマーのセット(プライマー1、プラ*

<反応液の組成>

精製水	36.5 μL
10×PCRバッファー	5 μL
2.5mM dNTP	4 μL
Taq FP (ニッポンジーン社製)	0.5 μL
20 μM プライマー	2 μL
30 ng/μL ターゲット核酸断片試料液	2 μL

【0062】(5) 電気化学的電流測定
前記(3)のポリメラーゼ伸長反応によるターゲット核酸断片の増幅反応に、ターゲット核酸断片を含まない試料液を用いた場合(コントロール)、男性から採取した血液から調整したターゲット核酸試料液を用いた場合 ※

<検出液の組成>

ポリメラーゼ伸長反応後の液	100 μL
キサントシン	0.82 g
ピロホスファターゼ	250 U
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	100 U
キサンチンオキシダーゼ	200 U
過塩素酸ナトリウム(0.1M) / MES(1mM)緩衝液(pH6.4)	400 μL

【0064】上記検出液に、(1)で作製した酸化還元活性分子修飾電極を浸漬し、印加電圧100乃至700mVの範囲で、ディファレンシャル・パルス・ボルタメトリー(DPV)測定を行った。次いで、印加電圧400mVでの応答電流値を求めたところ、コントロール、サンプルM、サンプルFについて、各々0.2 μA、-2.8 μA、及び-0.3 μAであった。DPV測定は、パルス振幅50mV、パルス幅50mSおよびスキャン速度100mV/秒にて行った。

【0065】実施例1は、酸化還元活性分子修飾電極を用いて、男性に特有に存在するY染色体短腕上のSRY遺伝子関連部位を特異的に検出できることを示している。この実施例1の結果より、本発明のポリメラーゼ伸長反応の進行により生成するピロリン酸に対して、少なくとも一種の酸化酵素を含む酵素反応試薬を作用させ、酸

16

*イマー2)として合成した。

【0059】<プライマーの塩基配列>

プライマー1: 5'-GATCAGCAAGCAGCTGGGATACACGTG-3'

プライマー2: 5'-CTGTAGCTTCCCGTTGCGGTG-3'

【0060】(4) ポリメラーゼ伸長反応によるターゲット核酸断片の増幅

以下に示す反応液の組成で、PCRによるターゲット核酸断片の増幅を実施した。PCRは、[デネイチャー: 94℃・30秒、アニーリング: 65℃・30秒、ポリメラーゼ伸長反応: 72℃・1分]を30サイクル繰り返し返すことで実施した。

【0061】

※(サンプルM)、及び女性から採取した血液から調整したターゲット核酸試料液を用いた場合(サンプルF)の、各々の反応後の液を用いて、以下に示す組成の検出液を調製した。

【0063】

化還元活性分子修飾電極を用いて電気化学的に電流を測定する方法により、ターゲット核酸断片の存在を検出することが可能であることがわかる。

【0066】実施例2 酸化還元活性分子修飾電極を用いたアルデヒド脱水素酵素遺伝子(ALDH2遺伝子)関連部位の1塩基多型(SNPs)検出

(1) ターゲット核酸断片試料液の調製
予め塩基配列のシーケンシングにより、ALDH2遺伝子関連部位の特定の1塩基種が異なることにより、ALDH2活性型またはALDH2不活性型であることが既知である、各々1人から採取した血液検体をもとに、実施例1の(2)に記載されている方法と同様にして、ターゲット核酸断片試料液を、各々サンプルALDH2活性型、及びサンプルALDH2不活性型として調製した。

(10)

17

【0067】(2) プライマーの設計

プライマーは、12番染色体上のALDH2遺伝子関連部位のなかで、ALDH2の活性を決定する特定部分について、ALDH2活性型の塩基配列に特異的なプライマーとして設計した塩基配列を持つ、オリゴヌクレオチドのプライマー（プライマー1）と、前記特定部位の下流の塩基配列に特異的なプライマーとして設計した塩基配列を持つ、オリゴヌクレオチドのプライマー（プライマー2）のセットとして合成した。

【0068】＜プライマーの塩基配列＞

プライマー1：5' -CAGGCATACACTGAA GTGAAACTG-3'（下線部のGAAの塩基配列がAAAになるとALDH2不活性型となる）

プライマー2：5' -AGGTCCTGAACTTCC AGCAG-3'

【0069】(3) 酸化還元活性分子修飾電極を用いた電気化学的電流測定

酸化還元活性分子修飾電極の作製は実施例1の(1)に、ポリメラーゼ伸長反応によるターゲット核酸断片の増幅（PCR）は実施例1の(4)に、及びポリメラーゼ伸長反応を行った後の反応液の酸化還元活性分子修飾電極を用いた電気化学的電流測定は実施例1の(5)に記載されている方法と同様にして、印加電圧400mVでの応答電流値を求めたところ、コントロール、サンプルALDH2活性型、及びサンプルALDH2不活性型について、各々0.2μA、-2.5μA、及び-0.2μAであった。

【0070】実施例2は、12番染色体上のALDH2遺伝子関連部位のなかで、ALDH2の活性を決定する特定部分の塩基配列違いを特異的に検出できることを示している。この実施例2の結果より、本発明のポリメラーゼ伸長反応の進行により生成するピロリン酸に対して、少なくとも一種の酸化酵素を含む酵素反応試薬を作用させ、酸化還元活性分子修飾電極を用いて電気化学的に電流を測定する方法により、ターゲット核酸断片の塩基配列を検出することが可能であることがわかる。

【0071】

【発明の効果】本発明によれば、ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査、及び個人の遺伝的な特徴による遺伝的疾患の検査等に有効な、特定の塩基配列を有するターゲット核酸断片の、簡便かつ迅速な検出方法およびキットが提供される。

【0072】【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列の種類：合成DNA

配列：GATCAGCAAGCAGCTGGGATAC

18

ACGTG

【0073】

配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列の種類：合成DNA

配列：CTGTAGCTTCCCGTTGCGGTG

【0074】

配列番号：3

10 配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列の種類：合成DNA

配列：CAGGCATACACTGAAGTGAAAA CTG

【0075】

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：合成DNA

20 配列：AGGTCCTGAACTTCCAGCAG

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の実施形態を説明する概念図である。

【図2】 図2は、本発明のカートリッジ形態でのキットの例を斜視図である。

【図3】 図3は、本発明のカートリッジ形態でのキットを使用する場合のシステム構成を示す斜視図である。

【符号の説明】

10…カートリッジ形態のキット

30 21…基体

22…蓋

31…開口部

32…反応セル

33…検出部

41…細管

42…細管

51…酸化還元活性分子修飾電極

61…温度コントロール部

62…温度コントロール部

40 71…電気化学的電流検出器

81…プライマー

82…dNTP

83…ポリメラーゼ

84…酵素反応試薬

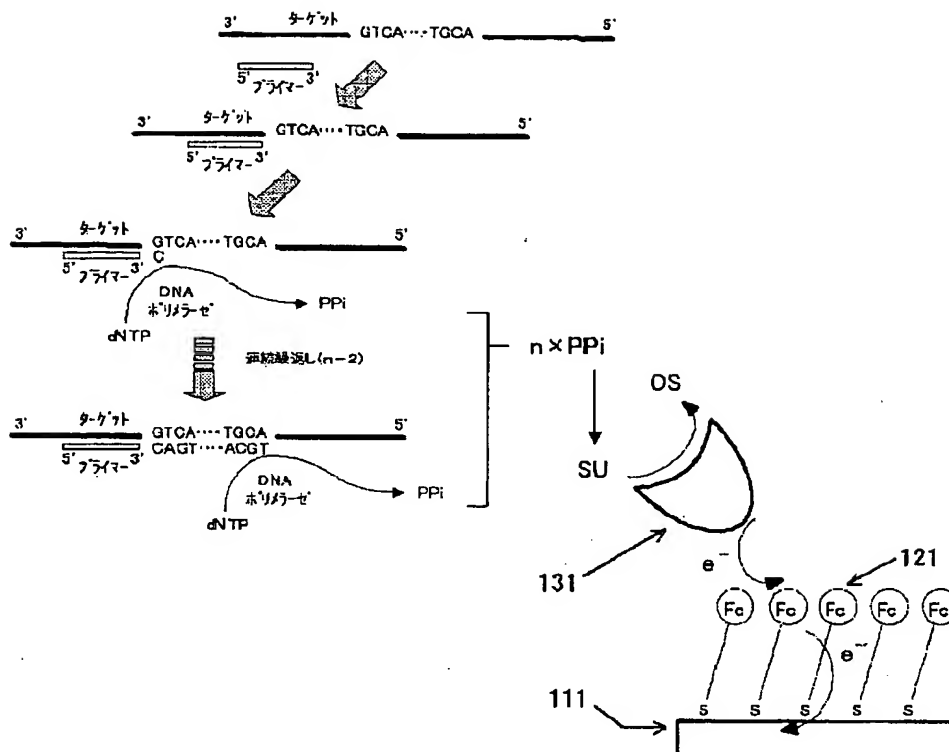
111…電極

121…酸化還元活性分子

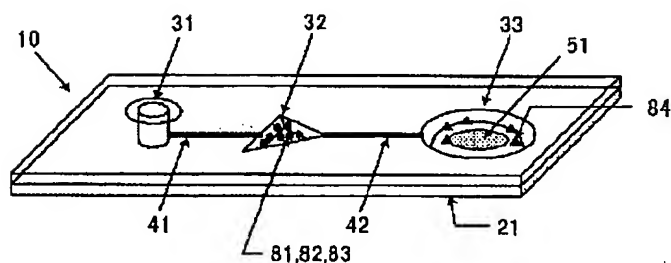
131…酸化酵素

(11)

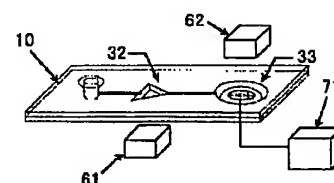
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G 0 1 N 33/50

識別記号

F I

G 0 1 N 27/46

27/30

ターム (参考)

3 3 6 M

3 5 1

(72) 発明者 阿部 義彦

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

Fターム (参考) 2G045 AA35 DA13 FB01 FB05

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08

QR42 QR62 QS25 QX04